

**Type A インスリン受容体異常症に認められたイン
スリン受容体チロシンキナーゼ領域の点突然変異（
Trp¹¹⁹³ Leu¹¹⁹³）**

著者	巖西 真規
発行年	1993-03-23
URL	http://hdl.handle.net/10422/1925

氏名・(本籍)	巖 西 真 規 (滋賀県)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	博士 (論)、第119号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成5年3月23日
学位論文題目	Type A インスリン受容体異常症に認められたインスリン受容体 チロシンキナーゼ領域の点突然変異 (Trp ¹¹⁹³ →Leu ¹¹⁹³)
審 査 委 員	主査 教授 大久保 岩 男 副査 教授 野 崎 光 洋 副査 教授 繁 田 幸 男

論 文 内 容 要 旨

[目 的]

35才男性。両親従兄弟結婚。OGTTで糖尿病型、高インスリン血症、黒色表皮症あり。OGTTで母は糖尿病型、妹は正常型で、ともに高インスリン血症を示した。Type A インスリン受容体異常症と考えられる症例についてインスリン抵抗性の機序解明のため、インスリン受容体の蛋白レベルでの機能、及びその遺伝子の解析を行なった。

[方 法]

①EBウィルス不死化リンパ球でのインスリン結合及び自己リン酸化能の測定 リンホプレップにより、分離されたリンパ球とEBウィルスを37℃ CO₂7%条件下で2時間孵置、トランスフォームした。インスリン結合は¹²⁵I標識インスリンにて測定した。培養リンパ球より、細胞をホモゲナイズした後、1%TritonX-100で可溶化し、WGAカラムに沈着させ、精製した。部分精製した受容体とインスリンと4℃、16hr孵置後、[γ-³²P] ATP、Mn、acetate、CTPによりなる溶液を加え、4℃、10分間反応させた。その後抗インスリン受容体抗体を加え、パンソルビンにて沈降させ、DTTを加え、5分間煮沸した。その上清をSDS-PAGEにより分離し、オートラジオグラフィーを行なった。

②genomic DNAの抽出及びDirect sequence患者のEBウィルス不死化リンパ球よりgenomic DNAを抽出し、これを鋳型にしてインスリンレセプター遺伝子の各エクソンをPCR法を用いて増幅した。PCR productsをセントリコン30を用いて遠沈後、上清をagarose gelに泳動して目的断片を切り出しSequenase ver 2を用いて、direct sequenceを行なった。

③genomic DNA及びcDNA上でのallele-specific oligonucleotide hybridization PCRによりExon20を増幅し、capillary blottingによりfilterに移し、プレハイブリ後、T4-Kinaseによりラベルされた正常primer、異常primerでのハイブリを検討した。

[結 果]

1) 培養リンパ球でのインスリン結合は正常下限を示した。2) 培養リンパ球より精製したインスリン受容体の自己リン酸化能はインスリン最大刺激時、正常の45%と低下を示した。3) Genomic DNAを用い、インスリン受容体遺伝子の各エクソンをPCR法にて増幅し、direct sequenceにより、kinase domainのExon 20のcodon 1193にTrp (TGG) →Leu (TTG)のヘテロ接合体としての点突然変異を認めた。4) 同部位の変異は本患者と同程度の抗インスリン血症を示す母親、妹にも

認められ、母親由来であった。

[考 察]

本症例では、インスリン受容体のインスリン結合は正常下限、自己リン酸化能の低下を認め、遺伝子の塩基配列の決定により、 β サブユニットのkinase domain であるコドン1193番目にヘテロ接合体としてTrp→Leuの点突然変異を認めた。即ち、患者培養リンパ球でのインスリン受容体のチロシンキナーゼの低下、遺伝子解析により kinase domain の、あらゆる tyrosine kinase familyでほぼ100%保存された部位での点突然変異を認め、本症例のインスリン受容体のチロシンキナーゼ活性の低下が予想されたが、site-directed mutagenesis によりmutant cDNA を作成し、COS7細胞にtransient expression した結果、Leu mutant receptor のチロシンキナーゼ活性は欠如していることを証明しており (unpublished data)、本症例のインスリン抵抗性の原因として、インスリン受容体のチロシンキナーゼ活性の低下が考えられた。母親、妹も本患者と同程度の高インスリン血症を示し、培養リンパ球から精製したインスリン受容体の自己リン酸化能も本患者と同程度の低下を認め、コドン1193番目のTrp→Leuのヘテロの点突然変異が存在することから、母親、妹のインスリン抵抗性も missense mutation によるインスリン受容体のチロシンキナーゼ活性の低下が生じたためと考えられた。しかしながら、本患者、母親、妹での皮膚症状及び糖尿病の発症の時期の差異は mutant 以外の、他の因子の関与が考えられた。

[結 論]

本症例はインスリン受容体遺伝子のkinase domain の Exon 20の codon 1193 にTrp→Leuのヘテロ接合体としてのmissense mutation を認め、インスリン受容体のチロシンキナーゼ活性の低下によるインスリン作用伝達障害のため、インスリン抵抗性が生じたと考えられた。

学位論文審査の結果の要旨

A型インスリン受容体異常症の一家系において、インスリン抵抗性の機序を解明するため、患者細胞のインスリン受容体機能、及びその遺伝子解析を行ない、以下の結果を得た。

1) インスリン結合は赤血球において、正常の約30%に低下し、培養リンパ球では正常下限を示した。2) 本人、母親、妹からの培養リンパ球より精製したインスリン受容体を用いた、インスリン最大刺激時の自己リン酸化能は、各々正常の約45%に低下していた。3) 遺伝子解析により、インスリン受容体遺伝子のチロシンキナーゼ領域がコードされているExon 20上に [Trp¹¹⁹³ (TGG) →Leu (TTG)] のヘテロ接合体としての点突然変異を認めた。4) Allele specific oligonucleotide hybridization により、変異遺伝子の存在を患者 genomic DNA 及び cDNA 上で確認した。5) 母親、妹において患者と同部位に同じ変異を認め、患者の変異遺伝子は母親由来であることを確認した。6) 変異部位はインスリン受容体 β サブユニットのチロシンキナーゼ領域にあり、チロシンキナーゼファミリータンパク質の中でも高度にアミノ酸配列が保存されている領域であり、点突然変異によりインスリン受容体のチロシンキナーゼの障害が生じたと考えられた。

以上より、本症例ではインスリン受容体遺伝子のチロシンキナーゼ領域がコードされているExon 20上に [Trp¹¹⁹³ (TGG) →Leu (TTG)] のヘテロ接合体としての点突然変異が認められ、その結果としてインスリン受容体のチロシンキナーゼ活性の低下が生じ、インスリン作用の情報伝達障害のため、インスリン抵抗性が生じたと考えられた。

本研究はA型インスリン受容体異常症のインスリン抵抗性の機序を明らかにしたものとして高く評価され、博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。